

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl⁷

G03F 7/00

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 99114435.X

[43]公开日 2000年6月7日

[11]公开号 CN 1255651A

[22]申请日 1999.9.10 [21]申请号 99114435.X

[71]申请人 朱纪军

地址 210095 江苏省南京市四牌楼2号

共同申请人 何农跃 陆祖宏

[72]发明人 朱纪军 何农跃 陆祖宏

贾佩凯 王建华 王鲁南

[74]专利代理机构 江苏省专利事务所

代理人 吴胜元

权利要求书2页 说明书9页 附图页数0页

[54]发明名称 基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化
合物微阵列芯片制备方法

[57]摘要

本发明基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化
合物微阵列芯片制备方法,是采用电子网板和丝网印刷技
术制备高密度基因芯片。其特征在于:(a)根据所需的
基因芯片设计制备微反应通道系统的微反应模板;(b):
利用微反应模板与基片之间的准确定位形成微反应区,
在微反应区加入对应的化学反应物;(c)按照设计的顺
序进行多次原位反应,通过定位装置,更换模板,变换微
反应区,从而在基片上形成所需的含不同化合物微单元
的高密度化合物微阵列芯片。

ISSN 1008-4274

99.09.24

权 利 要 求 书

1. 一种基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片制备方法，其特征在于：
(a) 根据所需的基因芯片设计和制备具有微反应通道系统的反应模板；(b) 利用微反应模板与基片之间的准确定位形成密封的微反应区，利用丝网印刷或喷淋的方法在微反应区加入对应的化学反应物；(c) 按照设计的顺序，通过定位装置，更换模板，变换微反应区，从而在基片上形成所需的含不同化合物微单元的微阵列芯片。
2. 根据权利要求 1 所述的基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片制备方法，其特征在于：微反应模板是采用电子网板工艺，利用光刻、腐蚀方法在金属的板材、带材上加工成具有所设计的微反应通道系统，直接作为微反应模板。
3. 根据权利要求 1 所述的基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片制备方法，其特征在于：微反应模板模板是采用电子网板工艺，利用光刻、腐蚀方法在金属的板材、带材上加工成具有所设计的微反应通道系统，利用之作为注塑或压塑成形的模具，利用注塑或压塑成形工艺获得的聚合物微反应模板。或者利用其作为板金成型的模块，在金属带板材上获得金属微反应模板。
4. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片制备方法，其特征在于：用于制备模板的材料可以是金属的板材、带材，或聚合物材料带、板、膜。
5. 根据权利要求 1 的基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片制备方法，其特征在于还可以往微反应模板中利用电镀、刷镀、真空镀方法使之表面惰性化或者利用分子修饰法使之在基片形成微区上有利于密封，同时引入在微反应区催化剂或生物酶。
6. 根据权利要求 1 所述的基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片制备方法，其特征在于：同一个基片上的多次原位反应，位置可以是重迭的，也可以是不重迭的。
7. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片制备方法，其特征在于：微反应过程中，通过往反应区引入声、光、热、电或/和磁能量可加速反应。

99-09-24

8. 根据权利要求 1 所述的基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片制备方法，其特征在于：在基片微反应区加入化学反应物、进行微反应是在真空或对微反应无不良作用的气体中进行的。

9. 根据权利要求 1 或 8 的基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片制备方法，其特征在于：对微反应无不良作用的气体为氮气和氩气。

基于电子网板和丝网印刷技术 的高密度化合物微阵列芯片制备方法

本发明基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片的制备方法涉及的是一种制备化合物微阵列芯片，尤其是高密度基因芯片的新方法，该新方法的核心是采用电子网板和丝网印刷技术制备高密度基因芯片。所制备的高密度基因芯片微阵列探针数目大于 $10000/cm^2$ ，应用该技术，可一次同时制备上千片相同或不同芯片。

化合物微阵列芯片对于生命科学研究是非常重要和必要的。生物物质的序列是通过芯片上的已知化合物分子阵列与被测定的生物分子之间的相互作用进行检测或测序。以核酸检测为例，首先将大量核酸片断以预先设计的方式固定在基片上或直接原位合成在基片上构成制备寡核苷酸分子探针阵列，即化合物微阵列，然后使待测基因与寡核苷酸分子探针阵列进行杂交，通过计算机对杂交结果进行分析而获得待测基因序列的信息。在基因芯片的制备中，最关键点在于寡核苷酸分子探针阵列的制备。

人们希望芯片的探针阵列空间分辨率高，并且合成工作量小，速度快，方法简单，成本低。目前，有两种制备寡核苷酸探针阵列的方法。一种是利用常规固相合成技术分别合成好需要的单个探针分子，然后利用喷打或印刷技术将不同的探针分子结合到基片上的不同位置，从而形成探针阵列。利用喷打或印刷方法制备探针阵列很难达到较高的空间分辨率，并且在探针分子制备时为逐个合成，合成工作量大。另一种方法是美国 Affmetrix 公司提出的利用模板定域光化学反应，在基片上原位合成探针阵列。利用这种方法制备探针阵列可达到较高的空间分辨率 ($40\times40\mu m^2$)，而且在片合成时为并行合成，杂交检测时背景较高，不便于定量检测，合成速度快。但由于光化学反应产率较低，反应中副反应较多，使得合成探针序列正确率不高，而且需要具有特殊保护基团的试剂，成本较高。此外，掩

99.09.24

模板孔径较小时会发生光衍射现象，制约了探针密度的进一步提高。多次压印定点合成法制备化合物微阵列芯片的方法，专利申请号：98199220.x 提出了基于分子印章技术的化合物微阵列芯片制备方法，该方法的核心包括两个方面：（1）运用微电子光刻和高分子化学成模技术制备一套具有预设计图案花样的分子印章；（2）按设计顺序通过分子印章将碱基单体依次定点压印到固体基片上，最终得到所需的微探针阵列。该方法具有合成效率高，便于批量生产，省时的优点，但由于基于半导体工艺的基片（硅片或玻璃片）易碎裂，在精细加工时往往影响成品率的提高。此外，由于目前微电子光刻技术只能加工 3、4、5、6 英寸片（硅片），限制了一次生产芯片的数量。因此，探索更佳的化合物微阵列芯片制备方法是当务之急。

本发明的目的就是针对目前化合物微阵列芯片制备存在的不足之处，提供一种基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片的制备方法，采用电子网板技术获得微反应模板，连续原位合成制备微阵列芯片，该制备方法简单、可靠、空间分辨率高、正确率高是一种基因芯片的制备新方法。

基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片的制备方法是采取以下方案实现的：一种基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片的制作方法，其特征在于：（a）根据所需的基因芯片设计和制备具有微反应通道系统的微反应模板；（b）利用微反应模板与基片之间的准确定位形成密封的微反应区，利用丝网印刷或喷淋的方法在微反应区加入对应的化学反应物；（c）按照设计的顺序，通过定位装置，更换模板，变换微反应区，从而在基片上形成所需的含不同化合物微单元的微阵列芯片。

根据本发明的方法，其中步骤（a）中，微反应模板是采用电子网板技术对钢带（板）、铝带（板）、铜带（板）等金属的薄带（板）材料进行微加工后得到具有所设计的微反应通道系统，直接作为微反应模板。即利用微印刷制版、光刻技术，使用于电子网板技术的薄

带（板）材料一面或双面带有与微流体通道系统相对应的微结构图形。然后，再经化学腐蚀使上述带有微结构图形的薄带（板）材料呈现出凹凸沟槽、微孔等预想的微反应通道系统，得到制备化合物微阵列芯片所需的母板，也就是生物（基因）芯片的微反应模板；或者利用获得的金属材料模板作为注塑或压塑材料的模具，将聚合物材料充满模腔后通过注塑成形或压塑成形获得的塑料微反应模板；或者利用静态的或动态的，单面的或双面的化学方法在金属板材表面加工出凹凸的沟槽、孔等而获得微反应模板；或者利用板金成型方法在腐蚀金属带材表面形成微流体的腔槽，获得微反应模板。

根据本发明方法，其中步骤（b）中，制备的微反应模板与基片之间可以采用机械密合或者热键合，或者高分子键合的工艺，同时在模板与基片之间表面加入疏水的基团，减少反应的侧漏或者采用油封工艺减小侧漏。同时采用丝网印刷技术，采用手动或自动机械式的挤压，自动喷淋等方法，使反应液充满反应区，从而在基片表面形成化合物的微阵列。

根据本发明方法，在其中步骤(b)中，还可在微反应模板与基片反应过程中加入促进反应物连接到基片上的催化剂或生物酶。

根据本发明的方法，其中步骤（c）中，同一基片上多次原位合成的化学反应位置，可以是重迭的，也可以是不重迭的。

根据本发明的方法，其中步骤（c）中，按设计顺序，采用原位插片设计或自动线流程设计，将不同模板与基片密合，完成各步反应后形成所需的含有不同化合物微单元的微阵列芯片。即微反应模板的装配可以是插入式的装配或者采用连续带卷式的装配密合，利用精密的定位装置，可以在基片的表面合适位置上与模板上的合适位置形成反应空间，进行化学反应从而在基片上形成化合物微阵列，或者采用级进模工艺，将基片与模板按设计的顺序进行组合，然后引入反应物进行反应，同时可以通过往基片和模板的反应微区引入声、光、热、电或/和磁等能量，加速原位上的化学反应。

99.09.24

根据本发明的方法，其中的步骤（b）和（c）是在真空或对步骤（b）和（c）无不良作用的气体中进行的，其中所述的气体选自氮气，氩气。

根据本发明，更具体地讲，用于原位反应的微反应模板的制备方法是利用电子网板制备方法，先按设计的形状得到模板的掩板（掩膜），然后利用曝光方法对涂有感光胶的基材（金属薄（板）带材）进行曝光，待曝光后进行选择性化学腐蚀，从而得到所需的金属基材的模板。可以采用动态双面腐蚀，或者静态单面腐蚀的方法。

根据本发明，用于原位微反应模板的设计是针对不同的芯片设计出来的带有沟槽、孔等的微反应流体系统，通过工艺的优化，可进一步提高芯片上的微探针阵列密度。

根据本发明，微反应模板的另一种制造方法是将上面的金属模板作为高聚物的注塑或压塑反应的模具，然后通过注塑（压塑）成形的工艺获得高分子的模板。

根据本发明，微反应模板的再一种制造方法是利用上面的金属模板作为板金成型的模具，从而在金属的带材表面冲压成型获得所需的模板。

根据本发明，原位反应微反应模板的材料可以是金属的带（板）材料或者高分子材料。

根据本发明，在金属微反应模板的制造过程中，可以采用动态动压腐蚀的方法，利用大生产的工艺在连续线上获得微反应模板，也可以利用静压腐蚀工艺，通过优化腐蚀工艺参数获得。

根据本发明，利用精密定位的装配，微反应模板与基片之间通过键合工艺和密封工艺，形成一系列的微反应区。利用设计的微流体通道，使得反应区发生化学的反应，从而在基片上形成化合物的微阵列。反应液的进入可以采用丝网印刷的工艺即利用滚轮（板）等将液体挤入反应区，或者采用喷淋的方法，或者气体驱动的方法使得液体进入微反应区进行反应。

根据本发明，在同一基片上的多次原位反应的位置，可以是重迭的，即在同一位置进

行多步化学反应同时还可控制多步化学反应的顺序，避免产生相互或交叉化学反应，也可以不重迭，进行定点化学反应。在每次原位反应后，可对基片进行相应的清洗和化学处理，使之满足后续反应的要求。

根据本发明，在原位反应的过程中，可以通过在微反应池引入（超）声场能、光能、热能、电场、磁场、光致声表面波，表面激发共振等物理作用能，加速微区的化学反应，也可以在涂覆或注入微反应区的化学反应物溶液中加入催化剂或生物酶，通过化学方法加速化学反应，原位反应的过程以至整个微阵列芯片的制备过程可在真空或化学惰性的气体如氮气、氩气等环境中进行。

制备芯片的基材可以是硅，玻璃、陶瓷、金属、聚合物等无机或有机材料，以及在这些材料表面上修饰或组装的分子膜，其表面可以是致密的，也可以是多孔的。

基于电子网板和丝网印刷技术的高密度化合物微阵列芯片的制备方法与常用的方法相比，由于采用电子网板技术制作微反应的模板，模板制造工艺可靠，易于大批量生产，并且整个生产成本低。同时采用金属模板基材或者塑料模板基材，在原位合成的过程中，对模板的破坏机率下降，延长了模板的使用寿命。并且克服了以往硅工艺带来的硅片的破损严重的缺陷，提高了整个工艺的可靠性。通过在模板与基材的紧密结合，采用丝网印刷技术，提高了反应溶液的注入效率，同时便于大批量流水线生产。

本发明还涉及由本发明方法制备的化合物微阵列芯片，其中按本发明方法制备的化合物微阵列芯片具有高的空间分辨率，如用本发明方法制备 DNA 芯片的空间分辨率为 $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ ，及阵列的集成度高，如用本发明方法制备的 DNA 芯片的阵列数目可达 6.5536×10^4 个/平方厘米，正确率高，每步合成正确率在 99.5% 以上，20-mer 寡核苷酸的总正确率在 90% 以上。随着模板及相应的压印机械装置精度的提高，上述指标还可以大幅度提高。

下面的实施则是对本发明的进一步说明，但其不意味着对本发明范围的任何限制。

实施例 1, 高密度 DNA 微阵列芯片的制备。

A. 微反应模板的制备。利用电子网板技术将金属带引导进入洁净区，用清洗液将金属带清洗干净，进入烘干区烘干。然后在金属带的两面涂上光刻胶，经过匀胶区和烘干区后进入曝光区，利用设计好的曝光板在紫外光下曝光，再进入腐蚀区，经过动、静态的腐蚀，在金属带（板）上形成一系列微反池组成的微通道系统。经过再次冲洗和落料，可以获得所需的微流体系统的模板。微孔尺寸 $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ ，或者利用该模板作为注塑或压塑反应的模具，在模具腔中充入塑料液体，冷却成型后获得化合物微流体通道系统的模板。或者利用该模板作为冲压成形的模具，利用级进模工艺在金属带材上获得所需的模板。

B. 基片上制备寡核苷酸探针阵列。将玻片清洗、干燥后，分别放入 APTES(氨基丙基三乙氧基硅烷)的苯溶液中反应 2 小时，在苯中漂洗后再放入琥珀酸的苯溶液中反应 1 小时，从而在玻璃片表面形成羟基。整个基因芯片的制备过程均在氩气的保护之下进行。

把微反应模板通过高精度对准装置压置固定于基片表面，然后将另一带有液体密封圈的外罩板压置在微反应模板上，构成封闭的微流体系统。将其已用二对甲氧三苯甲基(DMT)保护的核苷酸 5'-OH 例如 dA-N-B₂ 和四唑(催化剂)的无水乙腈溶液注入封闭罩入口，并从封闭罩内腔流入模板上的微反应池。或者，按丝网印刷的方法，利用滚轮（板）或自动自动喷淋装置，将反应液充分注入微反应区。通过四唑的作用，脱氧三磷酸腺苷的 3'-OH 共价偶联在基片上。在基片上引入压电超声振动源，通过超声波作用，加速该化学反应的速度。当核苷酸与固体基片上的活性基因的反应后，被共价连接在基片表面，乙腈溶液通过在母板与基片间的微液体沟道被排出微流体系统。接着用苯硫酚(或三氯乙酸)的乙腈溶液脱去基片上核苷酸 5'-OH 上的保护剂 DMT，将 5'-OH 暴露。收集脱去的 DMT 液，调节至一定的体积，以 DMT-Cl 单体为标准液于 495nm 处检测 DMT 和光吸收值(OD 值)，根据相

09.09.26

邻二次 OD 值的比值，可以获得该层的合成产率。

将第一块模板取出，通过高精度对准装置，按照一定的顺序，将第二块模板压置固定于基片表面，重复上述过程，将不同的单核苷酸（如 dC-N-B₂,dG-N-iBu,T）在基片不同位置上重复上述过程，形成单核苷酸阵列。或者，利用导向系统将不同模板的卷带导向至基片密合位置，将模板压置与基片固定，重复上述过程，将不同的单核苷酸（如 dC-N-B₂,dG-N-iBu,T）在基片不同位置上重复上述过程，形成单核苷酸阵列。

重复上述原位合成的过程，可键合上第二、三、……层核苷酸分子。合成至二十层(即 20 个碱基长度的寡核苷酸)后，用 30% 氨水处理基片，以去除碱基及磷酸上的保护基团。将芯片用水洗净，干燥封装保存。至此，基因芯片制备完毕。或者，固定基片不动，将带有微流体系统的带（板）在导轮的牵引下，引入基片区，利用精密定位装置，将模板与基片固定在一起，重复上述过程，从而形成基因芯片。该芯片每个基因探针单元的尺寸为 $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ ，在 1cm^2 表面共有 6.5536×10^4 个不同的基因探针；根据 DMT 的 OD 测量方法，该芯片每层的合成效率在 99.8% 以上，合成探针的正确率为 95% 以上；每一层的制备时间约为 20 分钟，完成整个芯片的合成时间约为 6 小时左右。

实施例 2，高密度 PNA 微阵列芯片的制备。

肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)是一种带有碱基的寡聚 N-2 氨基乙基甘氨酸(N-(2-aminoethyl glycine)，是具有核苷酸性质的多肽类似物。PNA 可以与序列互补的 DNA、RNA 以及 PNA 杂交，并且其杂交具有高的热稳定性和对错配的高灵敏性。在一定的条件下，可以识别单个碱基的错配。因此，利用 PNA 序列制备高密度基因阵列芯片，可以大大提高基因芯片的杂交准确性和灵敏度，具有十分重要的应用前景。

高密度 PNA 微阵列芯片的制备过程为：

A. 微反应模板的制备。利用电子网板技术将金属带引导进入洁净区，用清洗液将金

属带清洗干净，进入烘干区烘干。然后在金属带的两面涂上光刻胶，经过匀胶区和烘干区后进入曝光区，利用设计好的曝光板在紫外光下曝光，再进入腐蚀区，经过动、静态的腐蚀，在金属带（板）上形成一系列微反池组成的微通道系统。经过再次冲洗和落料，可以获得所需的微流体系统的模板。微孔尺寸 $30\text{ }\mu\text{m} \times 30\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ ，或者利用该模板作为注塑或压塑反应的模具，在模具腔中充入塑料液体，冷却成型后获得化合物微流体通道系统的模板。或者利用该模板作为冲压成形的模具，利用级进模工艺在金属带材上获得所需的模板。

B. 制备四种分别含有胸腺嘧啶，胞嘧啶，腺嘌呤和鸟嘌呤四种碱基可用于 PNA 序列合成的单体，即 N-2 萍丁氧羰基氨基乙基-N-胸腺嘧啶-1-乙酰甘氨酸(Gly-T)，N-2 萍丁氧羰基乙基-N-胞嘧啶-1-乙酰甘氨酸(Gly-C)，N-2 萍丁氧羰基乙基-N-腺嘌呤-1-乙酰甘氨酸(Gly-A)和 N-2 萍丁氧羰基乙基-N-鸟嘌呤-1-乙酰甘氨酸(Gly-G)。

C. 基片上制备 PNA 探针阵列。将玻片清洗，干燥后，分别放入 APTES 苯溶液中反应 2 小时，从而在玻璃片表面形成氨基。整个基因芯片的制备过程均在氮气保护下进行的。按照设定的程序，将第一块微反应模板用精密对准的机械装置紧紧压置基片表面上，再将带有液体密封圈的外罩板压置在微反应模板上，构成封闭的微流体系统。将含有碱基的 PNA 合成单体，例如 Gly-A，以及五氟苯酯的溶液，通过五氟苯酯激活基片上的化学基团，使 Gly-A 的 C 端化学键合在基片上。在基片上引入压电超声振动源，通过超声波作用，加速该化学反应的速度。再更换不同的微反应模板，分别注入含不同碱基的 PNA 单体如 Gly-T，Gly-G，Gly-C 和五氟苯酯混合溶液，重复上述过程，形成单层单碱基 PNA 阵列，当第一层合成完毕后，用水合茚三酮法测定第一层的耦合率。重复上述压印过程，可键合上第二、三……层 PNA 单体分子。合成至二十层(即二十个碱基长度的寡聚准肽链)后，用 30%NaOH 水溶液处理基片，以去除碱基及磷酸上的保护基团。将芯片用水冲净，干燥封装保存。至此，

39.09.24

PNA 基因芯片制备完毕。

该芯片每个基因探针单元大小为 $30 \times 30 \mu\text{m}^2$, 在 1cm^2 表面具有 6.5536×10^4 个不同基因探针, 根据水合茚三酮法测量, 该芯片每层的合成效率在 99.9% 以上, 合成探针的正确率为 98% 以上。每一层的制备时间约为 1 小时, 完成整个芯片合成时间约为 24 小时左右。